

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
ОТДЕЛ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**КЛЕТОЧНЫЕ ЯДРА И ПЛАСТИДЫ
РАСТЕНИЙ:
БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Сборник материалов Международной конференции,
г. Минск,
26-28 мая 2004 г.

Минск
УП «ТЕХНОПРИНТ»
2004

**Клеточные
ядра
и пластиды
растений:**

биохимия и биотехнология

26-28
Май 2004 МИНСК



МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ ИЗУЧЕНИИ КЛЕТОК И ЯДЕР ТКАНЕЙ ПРОРОСТКОВ ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ

Булко О.П.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, г. Минск, ул. Сурганова 2В, e-mail: biolog@it.org.by

Проростки семян зерновых злаков с морфологической, физиологической и биохимической точек зрения представляют большой интерес. При набухании семян значительно увеличивается активность ферментов и синтез нуклеиновых кислот. Осуществляется реализация законсервированной наследственной программы в созревших семенах. В процессе прорастания происходит перераспределение молекулярных комплексов при тесном взаимодействии отдельных звеньев метаболизма. В проростке различные ткани сохраняют свою специфическую морфологию и отличительные молекулярные механизмы.

Количественные относительные показатели веществ при развитии растений часто не вскрывают сущности изучаемых процессов. В проростках различных сортов злаковых, различающихся по морфологическим признакам, пloidности и скорости прорастания мы часто находим одинаковые количественные показатели белков и нуклеиновых кислот в пересчете на единицу веса. Поэтому наиболее приемлемыми являются данные по абсолютному содержанию веществ на биологическую единицу – растительную клетку.

Были проведены исследования и разработан метод деления ткани на отдельные единицы-клетки при сохранении их прижизненных морфологических характеристик. Первые исследования были проведены на зародышах и проростках ржи, зародышах семян и листьях люпинов [1]. Затем методика была усовершенствована и упрощена, что позволило изучать клетки с неповрежденными ядрами и пластидами [2]. Методический подход заключается в фиксации растительного материала 30% водным этанолом, содержащем 4% глутарового альдегида с последующим замещением этих веществ в тканях соединением глицерин-соляная кислота (1 часть 12 н HCl и 1 часть глице-

рина). Непосредственное разделение тканей на клетки осуществляется их нагреванием при 100 °С в течение 30-40 сек и последующей гомогенизацией в пробирках. После отмывания клеток 30% водным раствором глицерина, клетки сохраняются в этом же растворе длительное время. Визуальные наблюдения и подсчет клеток для приведения к единице веса осуществляется под микроскопом в камерах Горяева или Фукса-Розенталя. «Жесткая» обработка тканей – выдерживание и кипячение в концентрированной соляной кислоте приводит к гидролизу и потере нуклеиновых кислот, в результате их содержание уменьшается более, чем в 200 раз. Окрашивание клеток такими красителями, как метиленовый синий, метиленовый зеленый, пиронин неосуществимо. Клетки и ядра хорошо видны под микроскопом, однако получение фотографий и компьютерная обработка клеток из этиолированных растений представляют определенные трудности. В связи с этим обстоятельством в суспензии клеток вводили йод в йодистом калии и клетки окрашивались в ярко коричневый цвет. Сродство клеток с йодом является необратимым процессом и клетки в суспензии поглощают определенное количество йода. В наших опытах исходный раствор красителя готовили из 0,25% йода и 0,50% йодистого калия в 50% этаноле. В суспензию клеток в количестве 100000-200000 в 3,0 мл 30% глицерина вводили 10-20 мкл исходного раствора красителя. Клетки после окрашивания отделяли центрифугированием, и надосадочная жидкость в ультрафиолетовой области имеет максимум поглощения при 290 и 350 нм. Контрольный раствор красителя в отсутствие клеток при 290 нм в кювет 1,0 см имел 1-2 оптические единицы плотности. Таким образом, при спектрофотометрировании надосадочной жидкости можно было судить о количестве поглощенного клетками йода.

На рис. 1 представлены окрашенные йодом клетки колеоптилей и эпикотилей на 3-х этапах их возрастного развития при высоте проростков 2,0; 4,0; 6,0 см. Окулярная шкала микроскопа давала возможность определять размеры клеток и ядер.

На рис. 2 представлены спектры оптической плотности надосадочных жидкостей после окрашивания клеток йодом и отделения их центрифугированием на 3-х этапах развития

проростков. Исходный раствор имел 2,0 оптические единицы плотности при толщине кюветы 1,0 см.

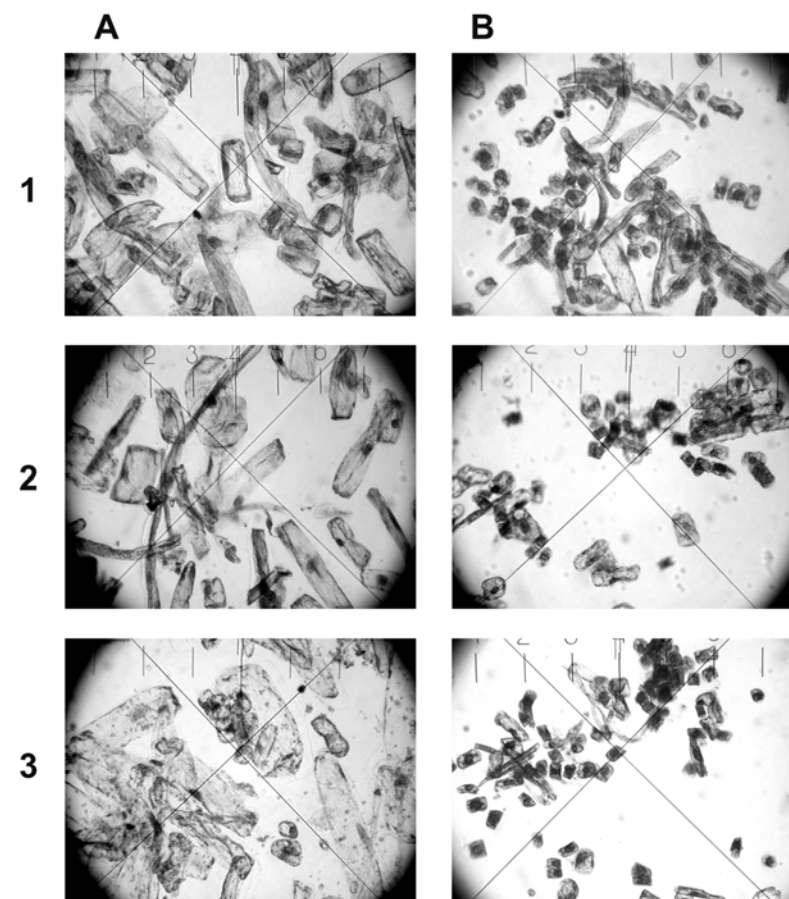


Рис. 1. Клетки колеоптилей (А) и эпикотилей (Б) после окрашивания раствором йода.
1, 2, 3 – возрастные этапы развития проростков.

Ядра, выделенные из 7-дневных проростков ржи при использовании градиента плотности сахарозы и глицерина (рис. 3), были также окрашены йодом. Суспензия состояла из

200000 ядер в 3,0 мл раствора. Контрольный раствор красителя имел 1,0 оптическую единицу плотности при толщине кюветы 1,0 см (рис. 4). Ядра колеоптилей и эпикотилей имели отличительные особенности по оптической плотности.

В наших исследованиях, проведенных ранее, разделение тканей зародышей на клетки различных сортов ржи позволило определить их величину и массу, содержание в них нуклеиновых кислот и судить о генетической информативности зародышей [3].

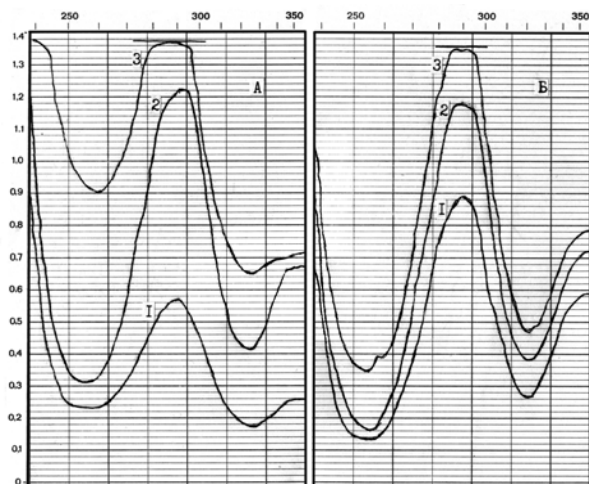


Рис. 2. Спектры оптической плотности надосадочной жидкости после окрашивания клеток йодом и отделения их центрифугированием.

А – колеоптили, Б – эпикотили; 1, 2, 3 – возрастные этапы развития проростков. Исходная оптическая плотность раствора йода – 2,0 о.е.

Исследованы цитологические и молекулярно-генетические эффекты проявления взаимодействия исходных геномов пшеницы и ржи у тритикале [4]. Получены данные о количестве ДНК и РНК линий тритикале и их исходных родительских сортов в клетках зародышей, проростках семян и клетках флагового листа, а также количество цистронов рРНК [5].

Описанный нами методический подход позволяет проследить средство клеток и ядер с йодом. Клетки колеоптилей в проростках зерновых злаков, как видно на рис. 1 имеют большую величину по сравнению с клетками эпикотилей. Колеоптили выполняют защитную функцию при прорастании семян в почве. Эпикотили находятся в постоянном развитии. Отношение ядро/цитоплазма в этих тканях различно. В то же время колеоптили и эпикотили развиваются одновременно.

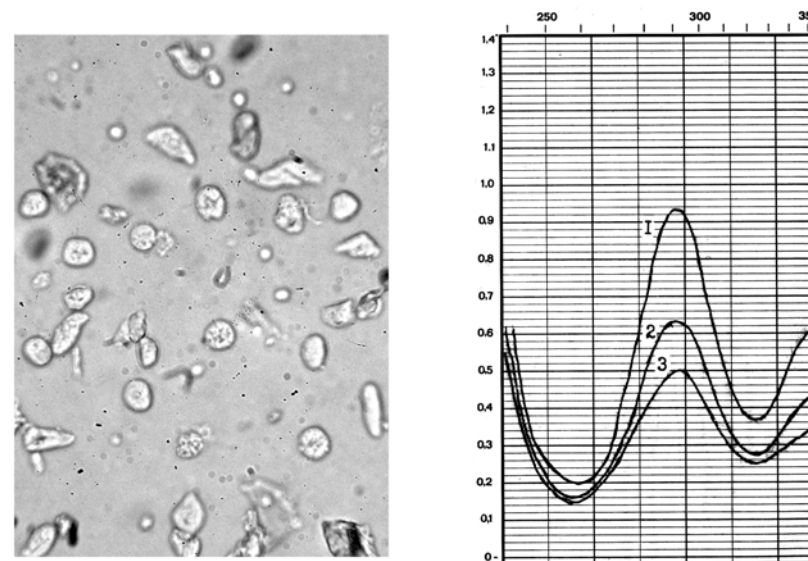


Рис. 3. Ядра выделенные из 7-дневных проростков ржи.

Рис. 4. Спектры оптической плотности надосадочной жидкости после окрашивания ядер раствором йода.

1 – исходный раствор; 2 – эпикотили; 3 – колеоптили.

По мере развития проростков при одинаковом количестве клеток в реакционной среде средство с йодом уменьшается. Величина поглощения надосадочной жидкости при 290 нм увеличивается, что свидетельствует об уменьшении средства клеток с йодом.

В работе В.Г. Конарева [6] обсуждается способ цитохимического обнаружения целлюлозы окрашиванием препаратов

хлор-цинк-йодом. Водный раствор этой смеси окрашивает целлюлозу в лиловый цвет, одревесневшие части клеточной ткани – в желтый.

Возможно, сохранившийся целлюлозный каркас клеток при кислотной мацерации и определяющий форму клеток, близкой к нативной, является субстратом для сродства с йодом. Этот методический подход дает возможность обсуждать различные физиологические аспекты состояния тканей, клеточных ядер проростков в процессе их развития.

Результаты, приведенные в данной работе, получены при использовании проростков ржи и принципиально близки для проростков пшеницы и тритикале.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булко О.П., Самаль Т.Е. Разделение и подсчет клеток в растительных тканях. // Весці АН БССР сер. біял. навук, – 1981. – № 4, – С. 101-103.
2. Вечер А.С., Булко О.П. Количественное определение содержания субклеточных структур в растительной клетке. // Весці АН БССР сер. біял. навук, – 1985. – № 3, – С.104-105.
3. Вечер А.С., Булко О.П., Шумская Т.Е. Величина и масса клеток зародышей ржи как функция их генетической информации. // Сб. Физиолого-биохимические основы повышения продуктивности растений. Минск. Наука и техника. 1980. – С.13-17.
4. Вечер А.С., Булко О.П., Гордей И.А., Малюш М.К., Мичелев М.М. Экспрессия геномов пшеницы и ржи у тритикале. // Докл. АН БССР. –1985. – Т.29, – № 9, – С. 846-848.
5. Булко А.П., Гардзей І.А. Колькасць ДНК і рДНК у клетках ліній трыцікале і іх зыходных бацькоўскіх сартоў на асобных этапах развіцця раслін // Весці АН БССР сер. біял. навук, – 1989. – № 2, – С. 44-47.
6. Конарев В.Г. Цитология и гистохимия растений. – 1966. –319 с.